



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : A61K 7/48	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO-00/59466 (43) Date de publication internationale: 12 octobre 2000 (12.10.00)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR00/00818</p> <p>(22) Date de dépôt international: 31 mars 2000 (31.03.00)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 99/04165 2 avril 1999 (02.04.99) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): LVMH RECHERCHE [FR/FR]; 20, avenue Hoche, F-75008 Paris (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): NIZARD, Carine [FR/FR]; 31, rue Raspail, F-94200 Ivry Sur Seine (FR). PROVOST, Nicolas [FR/FR]; 4, place Arthur Dussault, F-94220 Charenton (FR). VIRON, Cécile [FR/FR]; 70, boulevard A. Martin, F-45000 Orléans (FR). KRZYCH, Valérie [FR/FR]; 53, rue de Mizalin, F-45460 Les Bordes (FR). SAUNOIS, Alex [FR/FR]; 2, rue Daniel Mayer, F-45000 Orléans (FR).</p> <p>(74) Mandataires: PORTAL, Gérard etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cedex 07 (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues.</p>	
<p>(54) Title: COSMETIC COMPOSITION COMPRISING AT LEAST ONE SUBSTANCE PROMOTING THE FORMATION OF CONNEXIN AND COSMETIC TREATMENT METHOD</p> <p>(54) Titre: COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT UN EXTRAIT LIPIDIQUE DE SKELETONEMA</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to cosmetic compositions comprising the following: an active ingredient such as at least one substance that promotes intercellular communication of skin cells, especially keratinocytes, and fibroblasts and pre-adipocytes of the skin; the use of at least one substance promoting intercellular communication of keratinocytes, fibroblasts and pre-adipocytes of the skin as a cosmetic agent, optionally in the presence of a cosmetically acceptable vehicle; a method for promoting and/or increasing the activity of a cosmetic agent acting directly in the cell or via second intracellular messengers, and a method for treating ageing of the skin using cosmetics.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>La présente invention a pour objet: des compositions cosmétiques comprenant, à titre d'ingrédient actif, au moins une substance favorisant la communication intercellulaire des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau; l'utilisation d'au moins une substance favorisant la communication intercellulaire des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau, comme agent cosmétique, éventuellement en présence d'un véhicule cosmétiquement acceptable; un procédé pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'un agent cosmétique agissant directement dans la cellule ou par l'intermédiaire de seconds messagers intracellulaires, et un procédé de traitement cosmétique anti-vieillessement de la peau.</p>		

EX-8, page 24

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Gambie	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

COMPOSITION COSMETIQUE COMPRENANT UN EXTRAIT LIPIDIQUE DE SKELETONEMA

- 5 L'invention concerne essentiellement une composition cosmétique comprenant au moins une substance favorisant la communication intercellulaire des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau, en particulier favorisant la formation de connexine, utilisation et procédé de traitement cosmétique.
- 10 La recherche de moyens de lutte contre le vieillissement de l'homme mobilise de nos jours un grand nombre de chercheurs. C'est en particulier le cas dans le domaine de la cosmétique où l'on cherche à lutter contre, ou au moins à ralentir, l'apparition des effets esthétiques et physiologiques du vieillissement cutané, tels que rides, perte d'élasticité de la peau, de couleur etc..
- 15 Le vieillissement de l'espèce humaine est caractérisé par de nombreux troubles qui touchent les tissus vivants. Les marques de ce processus naturel sont aisément décelables sur un organe tel que la peau (Montagna, W., & Carlisle, K. (1990). Structural changes in ageing skin. *British journal of dermatology*, 122 (35), 61-70). Le vieillissement de la peau est une conjonction de deux
- 20 phénomènes, un processus cellulaire intrinsèque (génétique) associé au vieillissement dit extrinsèque qui regroupe les agressions de l'environnement (Grove, G. L. (1989). Physiologic changes in older skin. *Clinics in geriatric medicine*, 5(1), 115-125). Les effets de la sénescence sur le tissu cutané sont visibles principalement par la formation des rides. Celles-ci sont le reflet des
- 25 changements importants qui ont lieu dans le derme et l'épiderme. L'homéostasie tissulaire, importante pour la peau, est modifiée au cours du vieillissement. Les jonctions communicantes participent à la régulation de l'homéostasie de la cellule, leur rôle dans le maintien de l'équilibre physiologique de la peau est donc important.
- 30 Les inventeurs ont mis en évidence un effet du vieillissement sur la capacité fonctionnelle des cellules à communiquer entre elles, notamment par l'intermédiaire des jonctions communicantes (JC) ou « gap junctions » (GJ), ainsi qu'un effet du vieillissement sur la quantité de connexine 43 présente dans les
- 35 cellules. Ils ont en effet démontré que capacité fonctionnelle des cellules à communiquer entre elles, notamment par l'intermédiaire des jonctions communicantes (JC) diminue avec l'âge. Ils ont également démontré que la

quantité de connexine 43 diminue avec l'âge. Les inventeurs ont donc montré l'intérêt d'utiliser des substances favorisant la communication intercellulaire, notamment à travers les JC, pour lutter contre les signes du vieillissement cutané, en particulier pour ralentir leur apparition. Il s'agit là d'un nouveau moyen pour
5 lutter contre le vieillissement cutané, en particulier contre les rides et la perte d'élasticité de la peau.

Les jonctions communicantes (JC) ou Gap Junctions (GJ), sont des structures protéiques transmembranaires permettant le passage de petites molécules (<1000 Da) entre deux cellules (Watt, F. M. (1991). Intercellular
10 communication via gap junctions. In L. A. Goldsmith (Eds.), Physiology, biochemistry, molecular biology of the skin (pp. 857-859). New York Oxford : Oxford university press). Ces structures hexamériques sont appelées connexons qui sont eux mêmes formés de connexines.

Lorsqu'un contact intercellulaire est établi, les connexons d'une cellule
15 s'alignent bout à bout avec ceux de la cellule voisine, établissant ainsi un canal jonctionnel (Goodenough, D. A., Golier, J. A., & Paul, D. L. (1996). Connexins, connexons, and cellular communication. Annual review of biochemistry, 65, 475-502). Ces jonctions communicantes (JC) permettent le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Les connexines font partie d'une famille de protéines ayant
20 chacune des spécificités tissulaires. La connexine 43 est la protéine majoritaire des kératinocytes (Salomon, D., Saurat, J.-H., & P., M. (1988). Cell-to-cell communication within intact human skin. Journal of clinical investigation, 82, 248-254). Dans la peau, les JC sont présentes dans toutes les couches de l'épiderme à l'exception de la couche cornée.

D'autre part, il est connu que les molécules agissant sur le fonctionnement des cellules peuvent le faire, soit en pénétrant dans les cellules, soit sans pénétrer dans les cellules, mais en se fixant à des récepteurs présents sur la membrane plasmique cellulaire, déclenchant ainsi une série de réactions qui aboutissent à la libération de petites molécules appelées « seconds messagers » dans le cytoplasme
30 cellulaire. Ces seconds messagers de petite taille, tel que par exemple l'AMPc (3',5'-adénosine monophosphate cyclique), circulent d'une cellule à l'autre à travers les JC, transmettant ainsi l'information d'une cellule à l'autre. Il en est de même pour les molécules de petites tailles pénétrant dans les cellules, et capables de circuler d'une cellule à l'autre à travers les JC. Ainsi, en augmentant la
35 communication intercellulaire, notamment à travers les JC, les inventeurs ont mis

au point un nouveau moyen pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'un agent cosmétique.

De plus, les inventeurs ont montré que, de manière surprenante, l'utilisation de la boldine, ou indépendamment, l'utilisation d'extraits lipidiques de l'algue *Skeletonema costatum* permet de restaurer la communication intercellulaire, notamment à travers les JC et permet également d'augmenter le taux de connexine 43 présente dans les cellules de la peau, notamment dans les kératinocytes, les fibroblastes et des pré-adipocytes.

Ainsi, la présente invention a pour but principal de résoudre le nouveau problème technique consistant en la fourniture d'une nouvelle solution pour améliorer l'efficacité des compositions cosmétiques, en particulier pour lutter, ou au moins ralentir, l'apparition des effets esthétiques et physiologiques du vieillissement cutané, tels que rides, perte d'élasticité de la peau, de couleur, etc..

Selon la présente invention, ce problème technique a été résolu pour la première fois, d'une manière surprenante et non évidente, par la découverte qu'une substance favorisant la communication intercellulaire des kératinocytes, des fibroblastes et des pré-adipocytes de la peau permet de fournir une composition cosmétique ayant des propriétés améliorées, en particulier pour lutter contre, ou au moins ralentir, l'apparition des effets esthétiques et physiologiques du vieillissement cutané, tels que rides, perte d'élasticité de la peau, de couleur, etc..

D'autre part, la présente invention a permis de découvrir également de manière inattendue et non évidente qu'une substance favorisant la formation de connexine, en particulier de connexine 43, permet de préparer une composition cosmétique à efficacité accrue, en particulier pour lutter, ou au moins ralentir, l'apparition précitée des effets esthétiques et physiologiques du vieillissement cutané.

Il a encore été découvert, selon la présente invention, de manière inattendue et non évidente, d'une part que la boldine et d'autre part, indépendamment, qu'un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue *Skeletonema costatum*, en particulier un extrait lipidique total de ladite algue, favorise la communication intercellulaire à travers les jonctions communicantes des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau, et permet ainsi de préparer une composition cosmétique à efficacité accrue, en particulier pour lutter contre ou ralentir l'apparition des effets esthétiques et physiologiques du vieillissement cutané, ou pour lutter contre les surcharges adipeuses.

Ainsi, selon un premier aspect, la présente invention est relative à une composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre d'ingrédient actif, au moins une substance favorisant la communication intercellulaire des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, la composition est caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire, favorise la communication intercellulaire à travers les jonctions communicantes des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la composition est caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire, favorise la formation de connexine, en particulier de connexine 43.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux de l'invention, la composition précitée est caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire comprend au moins un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue *Skeletonema costatum*, en particulier un extrait lipidique total de ladite algue.

Il est rappelé que l'algue *Skeletonema*, en particulier *Skeletonema costatum* (nommée SKC dans la suite du document), est une algue unicellulaire bien connue, du phylum des Chlorophytes, de l'embranchement des Chrysophycophytes, de la classe des Diatomophycées et de l'ordre des Centrales. Les Diatomophycées sont très répandues dans les eaux douces, marines ou saumâtres. La vie des espèces de cette classe peut être planctonique ou benthique. Le protoplasme est enfermé dans un frustule siliceux. *Skeletonema costatum* (SKC) est une espèce cosmopolite le plus souvent marine, que l'on trouve fréquemment associée aux efflorescences phytoplanctoniques des eaux côtières.

Selon un mode de réalisation avantageux de l'invention, cet extrait lipidique est caractérisé en ce qu'il s'agit d'un extrait obtenu par extraction de l'algue *Skeletonema* avec un solvant alcoolique choisi parmi le groupe consistant de l'isopropanol, de l'éthanol, et du méthanol.

Selon encore une variante de réalisation avantageuse, l'extraction est réalisée sous reflux.

Selon encore une variante de réalisation avantageuse, l'algue est congelée avant d'être extraite avec le solvant alcoolique, de préférence la congélation étant

réalisée à une température située entre - 40°C et - 20°C environ et pendant une durée comprise de préférence entre 1 et 7 jours environ.

Selon encore une variante de réalisation avantageuse, l'algue congelée est plongée directement dans le solvant alcoolique chauffé. Le choc thermique permet en effet de faciliter la décantation de la silice (issue du squelette des cellules des algues).

Selon encore une variante de réalisation avantageuse, dans le cas d'une extraction avec un alcool alcalinisé, l'extrait de l'algue précité est obtenu après la succession des étapes suivantes :

- 10 a) le solvant alcoolique est alcalinisé jusqu'à un pH compris entre 10 et 14, de préférence à un pH égal à 13, par exemple avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou avec une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium,
- b) les insolubles sont éliminés de la phase hydro-alcoolique,
- 15 c) de l'eau distillée est ajoutée à la phase hydro-alcoolique,
- d) la solution obtenue subit une extraction liquide-liquide avec un solvant apolaire non miscible avec la phase hydro-alcoolique, tel que par exemple l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane,
- e) la phase contenant le solvant apolaire est éliminée,
- 20 f) la phase hydro-alcoolique récupérée après élimination de la phase contenant le solvant apolaire, est acidifiée jusqu'à un pH compris entre 1 et 3, de préférence à un pH égal à 2, par exemple avec une solution aqueuse d'acide sulfurique ou avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique,
- 25 g) la solution obtenue après acidification subit une extraction liquide-liquide avec un solvant apolaire non miscible avec la phase hydro-alcoolique, tel que par exemple l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane,
- h) la phase hydro-alcoolique est éliminée,
- 30 i) la phase contenant le solvant apolaire récupérée après élimination de la phase hydro-alcoolique subit une évaporation afin d'obtenir une huile exempte de solvant apolaire, cette huile étant l'extrait recherché.

L'emploi d'un alcool alcalinisé, puis acidifié permet d'obtenir un extrait aux caractéristiques visuelles et olfactives acceptables dans des compositions cosmétiques (couleur jaune, et odeur acceptable).

Selon encore une variante de réalisation avantageuse, l'extrait précité est obtenu par extraction au CO₂ supercritique.

Selon encore une autre variante de réalisation avantageuse, avant toute autre opération d'extraction, on réalise une macération de l'algue dans le solvant alcoolique à température ambiante et de préférence pendant une durée comprise
5 entre 5 minutes et 80 minutes environ, et de préférence encore, pendant une durée comprise entre 20 minutes et 40 minutes environ.

Selon encore une autre variante de réalisation avantageuse, la quantité de solvant alcoolique utilisée est comprise entre 0,1 litre et 20 litres environ de
10 solvant, de préférence comprise entre 2 litres et 10 litres environ de solvant, pour 100 g d'algue, exprimés en poids sec d'algue.

Selon encore une autre variante de réalisation avantageuse, l'extraction peut-être réalisée sous atmosphère inerte, de préférence sous atmosphère saturée en azote. Ceci permet d'éviter en particulier une dégradation oxydative prononcée
15 des molécules actives.

Le conditionnement de cet extrait lipidique est réalisé de préférence sous gaz inerte tel que de l'azote afin de protéger les molécules actives.

Selon encore une autre variante de réalisation avantageuse, la composition précité est caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,01% à 10% environ, et en
20 particulier de 0,1% à 3% environ en poids dudit extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue *Skeletonema costatum* par rapport au poids total de la composition finale.

Selon un deuxième aspect, la présente invention concerne aussi l'utilisation d'au moins une substance favorisant la communication intercellulaire des
25 kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau, comme agent cosmétique, éventuellement en présence d'un véhicule cosmétiquement acceptable.

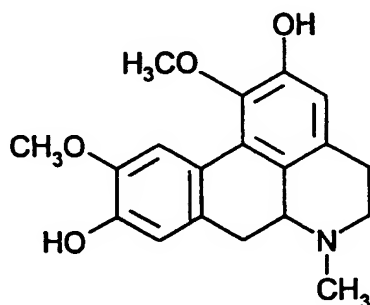
Selon un mode de réalisation particulier de l'utilisation, celle-ci est caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire,
30 favorise la communication intercellulaire à travers les jonctions communicantes des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau.

Selon un autre mode de réalisation particulier de l'invention, la substance favorisant la communication intercellulaire favorise la formation de connexine, en particulier de connexine 43.

35 Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la substance comprend au moins un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue

Skeletonema costatum, en particulier un extrait lipidique total de ladite algue, notamment tel que précédemment défini. Avantageusement, cet extrait précité est un extrait obtenu par extraction liquide-liquide entre un alcool alcalinisé puis acidifié et un solvant apolaire non miscible avec la phase hydro-alcoolique, tel que
5 par exemple l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane.

Selon un autre mode de réalisation de l'invention, la substance favorisant la communication intercellulaire des cellules de la peau est la boldine, produit qui répond à la formule ci-dessous :



10

avantageusement les compositions de l'invention qui renferment ladite boldine, en renferment à raison d'environ 0,001 à 10 %, avantageusement 0,01 à 1 %, en poids.

Selon un troisième aspect, la présente invention couvre aussi un procédé
15 pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'un agent cosmétique agissant directement dans la cellule ou par l'intermédiaire de seconds messagers intracellulaires, caractérisé en ce qu'il comprend l'application simultanée ou préliminaire à celle dudit agent cosmétique, sur les zones de la peau concernée d'une personne en ayant besoin, d'une quantité efficace d'au moins une substance
20 favorisant la communication intercellulaire, en particulier une substance favorisant la communication intercellulaire telle que précédemment définie.

Selon un quatrième aspect, la présente invention couvre aussi un procédé de traitement cosmétique anti-vieillessement de la peau, caractérisé en ce qu'il comprend l'application sur les zones de la peau concernée d'une personne en ayant
25 besoin, d'une quantité efficace d'au moins une substance favorisant la communication intercellulaire, pour obtenir un effet anti-vieillessement sur lesdites zones de la peau, notamment pour améliorer la fermeté cutanée, améliorer l'élasticité de la peau, retarder l'apparition des rides ou diminuer leur profondeur, en particulier une substance favorisant la communication intercellulaire telle que
30 précédemment définie.

Les exemples qui suivent sont donnés à titre purement illustratif de l'invention, en référence aux dessins annexés dans lesquels :

- la figure 1 représente la courbe de modulation de la communication intercellulaire en fonction de l'âge des donneurs. Elle est obtenue à partir de
5 kératinocytes isolés chez des donneurs d'âges différents par une méthode dite d'égratignure-chargement. La courbe est exprimée en fonction du rapport de la surface fluorescente sur la surface totale, en ordonnée, et en fonction de l'âge des donneurs, en années, en abscisse. « r » est le coefficient de corrélation ici égal à 0,76. Les mesures obtenues avec des donneurs jeunes sont représentées par des
10 carrés pleins avec l'écart type et les mesures notées avec des cercles blancs ont été obtenues sur des donneurs âgés, avec également l'écart type,

Cette figure est à lire en relation avec le tableau I (Exemple I),

- de même, la figure 2 représente encore une courbe de modulation de la communication intercellulaire en fonction de l'âge des donneurs, obtenue par une
15 méthode de micro-injection, mais cette fois ci exprimée en fonction du nombre de cellules marquées de kératinocytes, en ordonnée, et en fonction de l'âge exprimé en années, en abscisse, r représente encore le coefficient de corrélation ici égal à 0,91 et les mesures obtenues avec les donneurs jeunes étant notées avec des carrés noirs, avec leur écart type, tandis que les mesures obtenues avec les donneurs
20 âgées sont notées avec des cercles blancs, avec leur écart type,

Cette figure est à lire en relation avec le tableau II (Exemple I),

- la figure 3 représente l'évolution du taux de connexine 43 mesuré chez des kératinocytes de donneurs d'âges différents, obtenu en cytométrie en flux, exprimé en fonction du pourcentage de marquage en ordonnée et en fonction de
25 l'âge des donneurs (en années), en abscisse, avec un coefficient de corrélation r égal ici à 0,82. Les mesures obtenues avec les donneurs jeunes sont notées avec des carrés noirs avec leur écart type, et les mesures obtenues avec des donneurs âgées sont notées avec des cercles blancs, avec leur écart type,

Cette figure est à lire en relation avec le tableau III (Exemple I),

- la figure 4 représente les résultats de modulation de la communication intercellulaire chez des kératinocytes humains normaux, notés KHN, chez différents donneurs traités ou non avec un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema costatum*, en abrégé SKC, représentés sous forme d'histogrammes, exprimés en
30 fonction d'unité relative de diffusion en ordonnée, le bâton blanc étant obtenu avec des KHN témoins et le bâton grisé étant obtenu avec des KHN traités avec un

extrait lipidique de l'algue *Skeletonema costatum* à une proportion de 2,5 µg/ml/24h, in vitro,

Cette figure est à lire en relation avec le tableau VI (Exemple III),

5 - la figure 5 représente la mesure par la technique de micro-injection, de la modulation de la communication intercellulaire chez des kératinocytes humains normaux (en abrégé KHN) chez différents donneurs traités ou non avec un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema costatum*, en abrégé SKC, avec en ordonnée le nombre de cellules marquées, les résultats avec les KHN témoins, non traités, étant montrés avec un bâton blanc dit "témoin", et les KHN traités avec un extrait
10 lipidique de l'algue *Skeletonema costatum* ou SKC à la dose de 2,5 µg/ml/24h étant représentés par un bâton noir, dite traités,

Cette figure est à lire en relation avec le tableau V (Exemple III),

- la figure 6 représente encore un histogramme, obtenu à partir de résultats mesurés en cytométrie en flux, de la modulation de la quantité de connexine 43
15 par rapport à leurs témoins respectifs de donneurs d'âges différents traités avec l'extrait lipidique de l'algue *Skeletonema costatum*, en abrégé SKC, à la dose de 2,5 µg/ml/24h, avec en ordonnée le pourcentage d'augmentation par rapport à leurs témoins respectifs, et en abscisse l'âge des donneurs, en années.

Cette figure est à lire en relation avec le tableau VI (Exemple III),

20 D'autres avantages de l'invention apparaîtront au vu de la description et des exemples qui suivent.

Sauf indications contraires, les proportions données dans les exemples de compositions sont exprimés en pourcentage en poids.

25 **Exemple I - Mise en évidence de la diminution de la fonctionnalité de la communication intercellulaire par Jonctions Communicantes (CIJC) avec l'âge et de la diminution de la quantité de connexine 43 avec l'âge.**

I.1- Matériel et méthodes

30

I.1.1- Culture de kératinocytes humains normaux

Les cultures de kératinocytes humains normaux (KHN) sont réalisées à partir de prélèvements de peau.

Le prélèvement est dans un premier temps rincé 4 fois dans du PBS
35 (Phosphate Buffered Saline - Sigma) (tubes 50 ml). Il est ensuite décontaminé en le trempant dans deux bains successifs d'éthanol à 70% pendant 30 secondes.

Lorsque le prélèvement est décontaminé, il est placé dans une boîte de pétri contenant du PBS. On découpe alors des bandelettes de 1 mm de largeur en prenant soin d'éliminer un maximum de tissu adipeux et de derme. Les bandelettes sont placées au fur et à mesure dans une boîte de pétri contenant du PBS.

Pour pouvoir récupérer les kératinocytes de l'épiderme, on place les bandelettes pendant 4h à 37°C dans une solution de trypsine à 0,25% dans du PBS.

On dissocie ensuite le derme de l'épiderme par grattage des bandelettes au scalpel, les cellules épidermiques obtenues sont mises en suspension dans un tube contenant du milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium - Gibco) + 10% de SVF (Sérum de Veau Foetal - Eurobio). Après homogénéisation de la suspension, on élimine la partie superficielle constituée de cellules de la couche cornée et on filtre sur un tamis.

La partie filtrée est centrifugée pendant 5 minutes à 176 g. Le culot est repris avec du milieu KHN-D (DMEM + 10% SVF + hydrocortisone 0,4 µg/ml + EGF 10 ng/ml + toxine cholérique 10^{-9} M). Les cellules sont comptées puisensemencées à 15×10^6 cellules/flacon.

Après 24h de culture, le milieu est changé, les cellules sont rincées avec du PBS et on utilise pour la suite de la culture du milieu de prolifération K-SFM (Gibco).

Les kératinocytes se repiquent de manière tout à fait classique, mais il est nécessaire de les repiquer à 60-70% de la confluence pour qu'ils gardent leurs capacités à proliférer. Ainsi, lorsque les cellules sont à 60-70% de la confluence, le milieu d'entretien est éliminé et le tapis cellulaire est rincé avec du PBS. Les cellules sont mises en présence de 3 ml d'une solution de trypsine-EDTA, puis lorsque les cellules se détachent, la trypsine est inhibée par du milieu avec 10% de SVF (Eurobio). La suspension cellulaire est homogénéisée, récupérée puis centrifugée à 20 g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot ainsi obtenu est repris avec du milieu seul. Pour l'entretien, l'ensemencement se fait comme précédemment à 10^6 cellules/75 cm² dans des flacons ventilés et conservés dans les conditions citées plus haut. La confluence est obtenue au bout d'une dizaine de jours et les cellules peuvent être amplifiées pendant 6 à 7 passages.

Dans le cas où l'on souhaite tester l'activité d'une substance sur ces kératinocytes, on effectuera les test à partir du milieu de culture avec kératinocytes, au moment de la confluence décrite ci-dessus.

I.1.2- Egratignure-Chargement ou en anglais " Scrape loading"

Cette technique a été développée en 1987 par l'équipe de Trosko (El-Fouly, M. H., Trosko, J. E., & Chang, C.-C. (1987). Scrape loading and dye transfert a rapid and simple technique to study gap junctional intercellular communication. Experimental cell research, 168, 422-430). Elle repose sur l'utilisation d'un colorant, le Jaune de Lucifer (Lucifer Yellow - Sigma) de Poids Moléculaire (PM) = 457,2. Cette molécule (un aminophthalimide) est hautement fluorescente et ne diffuse qu'à travers les jonctions communicantes. Cette molécule ne passe pas à travers la membrane plasmique de cellules intactes. La couche cellulaire est lésée à l'aide d'un scalpel, ceci permettant au colorant l'accès aux Jonctions communicantes.

Les cellules à confluence sont rincées avec du PBS (Sigma) avant l'addition du colorant. 2 ml de Jaune de Lucifer (Sigma) à 0,05% dilués dans du PBS sont déposés sur les cellules et l' " égratignure (scrape) " a lieu à température ambiante. Six " égratignures (scrapes) " sont effectuées dans des boîtes de 60 mm. Les cellules sont laissées en présence du colorant pendant 5 minutes, puis celui-ci est retiré et récupéré. Les cellules sont alors rincées avec du PBS, afin d'éliminer l'excès de fluorescence. Elles sont fixées à l'aide de Paraformaldehyde (PFA) à 3% pendant 10 minutes. Les cellules sont à nouveau rincées avec du PBS, et après le rinçage, 2 ml de PBS sont laissés dans les boîtes.

Ensuite, les boîtes sont observées grâce à un microscope inversé à fluorescence muni d'une caméra qui permet l'acquisition des images. Six ou huit photos sont prises pour chaque boîte et sont ensuite analysées avec un logiciel d'analyse d'image (Perfectimage, Iconix). On quantifie alors, la fluorescence correspondant à la surface occupée par le Jaune de Lucifer dans les couches cellulaires. Pour cela, on dispose un rectangle de taille prédéfinie au niveau de la zone à étudier. L'ordinateur calcule et donne le rapport des surfaces : Surface fluorescente / Surface totale. Plus le rapport est élevé, plus la capacité des cellules à communiquer entre elles est grande.

30

I.1.3- Micro-injection

La préparation des cellules est semblable à celle utilisée par la technique d'égratignure-chargement ou en anglais "scrape-loading".

Grâce à la précision de cette technique, le Jaune de Lucifer (10% dans 0,33 M LiCl) est injecté directement dans une cellule, uniquement à l'aide d'un capillaire relié à un micromanipulateur (Leitz). L'injection est contrôlée par un

injecteur automatique (Tranjector 5246, Eppendorf), et dure 1 seconde avec une intensité de 10335 HPa. Les injections se font sous microscope inversé (20X) en contraste de phase (Microscope Leica, Fluovert FU). On réalise une vingtaine d'injections dans une boîte de pétri de 60 mm.

- 5 Après la fixation des cellules avec du paraformaldéhyde à 3%, les cellules sont rincées avec du PBS. L'observation et le comptage du nombre de cellules marquées sont ensuite réalisés.

1.1.4- Cytométrie en flux

- 10 Lorsque la confluence est atteinte, le milieu de culture est enlevé et les cellules sont rincées 2 fois avec du tampon PBS. Ensuite, elles sont trypsinées à l'aide d'un mélange de trypsine à 0,1% et d'EDTA à 0,02%. L'inhibition de la trypsine s'effectue avec du milieu de culture additionné de 10% de SVF. Un comptage du nombre de cellules à lieu, afin d'ajuster celui-ci à 10^6 cellules par tube. La suspension cellulaire est centrifugée à 176 g pendant 5 minutes et le culot
- 15 est repris dans 100 ml de PBS. On fixe les cellules avec du PFA à 3% pendant 25 minutes à 4°C. Pour éliminer le PFA, les cellules sont à nouveau centrifugées à 176 g pendant 5 minutes, et rincées 2 fois dans du PBS.

- 20 Le tampon, dans lequel les anticorps sont préparés, se compose de PBS, de 1% de SVF et de saponine (Sigma) à 0,2%, détergent qui induit une microporation de la membrane, mais qui n'abîme pas la cellule. Ce détergent est utilisé afin de garder intacte et de quantifier la connexine 43 intracytoplasmique mais aussi transmembranaire (Communication personnelle, R. Mouawad, Hôpital Salpêtrière - Paris).

- 25 L'anticorps primaire utilisé est l'anti-connexine 43 (Zymed, AC monoclonal fait chez la souris). La concentration de l'anticorps primaire doit être 1,3 µg/ml ($1/750^{\text{ème}}$). L'incubation est de 45 minutes à 4°C. Afin d'éliminer l'excès d'anticorps, les cellules sont centrifugées et rincées avec le tampon servant à la préparation des anticorps (PBS, saponine et SVF). Elles sont alors mises en
- 30 présence de l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la fluorescéine, à la dilution de $1/50^{\text{ème}}$ (Jackson Immunotech). Après l'incubation avec le deuxième anticorps, les cellules sont centrifugées et rincées, puis reprises dans 1 ml de tampon (PBS, saponine, SVF).

- 35 On mesure l'intensité de fluorescence dans les KHN traités comme décrit ci-dessus et dans des KHN qui n'ont pas été mis en présence de l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la fluorescéine, avec un cytomètre en flux (Epics

profile II de chez COULTRONIC), les mesures sont traitées et comparées par un logiciel (Phoenix flow system soft de chez COULTRONIC), qui nous donne une valeur mesurée dans une unité arbitraire donnée par la machine, que nous appelons : taux de marquage de la connexine 43 dans les KHN, qui reflète la

5 quantité de connexine 43 par KHN (en moyenne).

I.2- Résultats

I.2.1- Evaluation de la fonctionnalité de la Communication Intercellulaire par Jonctions Communicantes (CIJC) ou Gap Junctional Intercellular Communication (GJIC) en fonction de l'âge des donneurs.

10

I.2.1.1- Egratignure-Chargement ou "Scrape-Loading" (Figure 1)

L'étude a été menée sur 9 donneurs âgés de 40 à 75 ans.

15

Tableau I

Modulation de la communication intercellulaire
en fonction de l'âge des donneurs.

Age des donneurs (années)	surface fluorescente/surface totale (Moyenne)	Ecart type
40	0,41	0,06
41	0,40	0,05
43	0,60	0,07
47	0,33	0,14
48	0,10	0,08
67	0,31	0,06
68	0,33	0,08
70	0,25	0,05
75	0,21	0,04

On peut observer dans les résultats montrés dans le tableau I, et sur la figure 1 (en annexe), que la communication intercellulaire diminue en fonction de l'âge des donneurs, la capacité des kératinocytes à communiquer semble être

20 inversement proportionnelle à l'âge des donneurs.

Le coefficient de corrélation est de 0,76.

25

I.2.1.2- Microinjections (Figure 2)

L'étude a été menée sur les mêmes donneurs que pour l'égratignure-chargement ou "scrape-loading", excepté le donneur de 43 ans.

5

Tableau II

Modulation de la communication intercellulaire
en fonction de l'âge des donneurs

Age des donneurs (années)	nombre de cellules marquées (Moyenne)	Ecart type
40	15,1	3,6
41	16,9	5,4
47	11,8	3,2
48	10,1	2,2
67	8,6	2,7
68	8,7	2,6
70	5,9	2,4
75	6,8	1,7

10

A la lecture des résultats montrés dans le tableau II et sur la figure 2 (en annexe), nous observons une CIJC inversement proportionnelle à l'âge, mais avec cette technique plus précise que l'égratignure-chargement ou "Scrape-Loading", le coefficient de corrélation est de 0,91.

15

Les deux techniques, égratignure-chargement ou "Scrape-Loading" et Micro-injections, donnent des résultats qui vont dans le même sens : la fonctionnalité de la CIJC diminue avec l'âge de manière très significative.

I.2.2- Evaluation de l'effet de l'âge sur la quantité de connexine 43 (Figure 3)

20

Cytométrie en flux :

L'étude a été menée sur les mêmes donneurs que pour l'égratignure-chargement ou "scrape-loading", excepté le donneur de 43 ans et le donneur de 75 ans.

25

Tableau III

Taux de marquage de la connexine 43 dans les KHN, mesurés chez des kératinocytes de donneurs d'âges différents.

Age des donneurs (années)	Taux de marquage de la connexine 43 dans les KHN (Moyenne)	Ecart type
40	55,1	4,7
41	54,5	7,5
47	42,1	2,5
48	28,9	1,8
67	19,1	0,8
68	27,1	7,1
70	25,6	2,0

- 5 On observe dans le tableau III et sur la figure 3 (en annexe) une diminution du taux de connexine 43 en fonction de l'âge, la quantité de connexine 43 apparaissant être inversement proportionnelle à l'âge des donneurs.

Le coefficient de corrélation est de 0,82.

- 10 Ces résultats mettent en évidence un effet du vieillissement sur la capacité fonctionnelle des cellules à communiquer entre elles, notamment par l'intermédiaire des jonctions communicantes (JC) ou « gap junctions » (GJ), ainsi qu'un effet du vieillissement sur la quantité de connexine 43 présente dans les cellules. Ils montrent, en effet, que capacité fonctionnelle des cellules à
15 communiquer entre elles, notamment par l'intermédiaire des jonctions communicantes (JC) diminue avec l'âge. Ils montrent également que la quantité de connexine 43 diminue avec l'âge.

- Les inventeurs ont donc montré l'intérêt d'utiliser des substances favorisant la communication intercellulaire, notamment à travers les JC, pour lutter contre
20 les signes du vieillissement cutané, en particulier pour ralentir leur apparition. Ils ont donc mis au point un nouveau moyen pour lutter contre le vieillissement cutané, en particulier contre les rides et la perte d'élasticité de la peau.

- Les inventeurs ont donc également montré l'intérêt d'utiliser des substances favorisant la communication intercellulaire, notamment à travers les
25 JC, pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'un agent cosmétique. Ils ont donc mis au point un nouveau moyen pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'un agent cosmétique.

Exemple II - Obtention d'extraits lipidiques de l'algue Skeletonema costatum.

II.1 - Extraction à l'isopropanol, suivant un premier procédé

5 De préférence, l'ensemble de l'extraction sera réalisé sous atmosphère inerte (saturation en azote) afin d'éviter une dégradation prononcée des molécules actives.

Dans cette préparation, nous utilisons 250 kg de biomasse (Skeletonema costatum).

10 Les algues, qui ont été congelées à -20°C, sont plongées dans de l'isopropanol (IPA) sous reflux à 80-83°C, et ce sous agitation. Le choc thermique permet de faciliter la décantation de la silice (issue du squelette des cellules des algues).

15 La quantité de solvant utilisée est de 10 litres d'IPA pour 1 litre d'eau contenue dans la biomasse. Dans cette préparation, pour un pourcentage de matière sèche de 30%, les 250 kg de biomasse représentent une quantité de matière sèche de 75 kg et 175 kg d'eau. La quantité d'IPA engagée est ici de 1925 kg.

20 L'ensemble (biomasse + IPA) est porté sous reflux pendant une demi-heure sous agitation à environ 80°C, avant d'être refroidi vers 50°C.

Après le refroidissement de la masse réactionnelle vers 50°C, l'extrait est transféré dans un filtre de type GUEDU afin de réaliser la séparation biomasse épuisée / extrait lipidique sous IPA.

25 L'extrait lipidique est concentré dans un réacteur batch (Facteur de concentration = 71,5).

Le rendement par rapport au poids sec de cette première étape est de 28 % en huile brute.

30 Pour commencer la seconde étape, l'extrait lipidique est repris dans de l'IPA à froid à raison de 10 kg de solvant pour 1 kg d'huile. L'agitation est prolongée pendant 20 minutes. Le jus est ensuite filtré (ceci permet d'éliminer la boue collante résiduelle).

35 Le traitement de décoloration et de désodorisation est réalisé en deux batchs dans un réacteur schott de 80 litres et dure 30 minutes à température ambiante. La quantité de zéolithe (ABSENT 2000, fournisseur UOP) ajoutée est de 0,94 kg et celle de charbon actif (CXV, fournisseur CECA) est de 1,6 kg. Le rapport charbon sur zéolithe est de 1,7.

La zéolithe et le charbon sont ensuite éliminés par filtration sur papier.

Le rendement par rapport au poids sec de cette seconde étape est de 37%.

Ainsi, le rendement global en huile pour l'ensemble du procédé est de 10% par rapport au poids sec de biomasse.

- 5 Des antioxydants (du DL α -tocophérol à 0,05% final en poids et du palmitate d'ascorbyle à 0,05% final en poids) sont incorporés par une solution mère dans de l'IPA.

Le filtrat et les antioxydants sont ensuite concentrés en batch jusqu'à l'obtention d'une huile de couleur brune.

- 10 Le conditionnement de cet extrait lipidique (sous forme d'huile) est réalisé sous gaz inerte tel que de l'azote.

Cette huile sera nommée ci-après : l'extrait lipidique E1 de SKC.

II.2 - Extraction à l'éthanol suivant un second procédé

15

L'extraction débute par une dispersion de 49,8 kg de biomasse végétale congelée à 29% en masse sèche dans 539 kg d'éthanol à 96%, alcalinisés par 9 kg de solution aqueuse sodique à 30,5%. Après une macération de 30 minutes à 40°C sous reflux et sous atmosphère azotée, l'ensemble est refroidi à 18°C.

- 20 Les insolubles sont alors séparés par essorage sous azote et sont éliminés.

Les 573,9 kg de filtrat sont additionnés de 151 kg d'eau distillée. L'ensemble est agité lentement pendant 10 minutes pour être ensuite affronté à 162 kg d'heptane. L'épiphase heptanique de la partition liquide/liquide est éliminée. Notons que l'hypophase contient les acides gras sous forme saline.

- 25 L'opération est répétée deux autres fois.

Les 756 kg de solution relative à l'hypophase précédemment citée sont acidifiés par ajout de 2,8 kg d'acide sulfurique pour obtenir un pH de 2,2. L'ensemble est agité 10 minutes sous azote pour être ensuite affronté à 158 kg d'heptane. Les acides gras libres sont extraits des 147 kg constituant la première épiphase heptanique de cette nouvelle partition liquide/liquide. L'opération est répétée cinq autres fois pour récupérer au total 697 kg de phase heptanique. Cette phase évaporée à sec à l'évaporateur rotatif puis par distillation moléculaire fournit l'extrait actif soit une quantité représentant 1,1 kg d'huile.

30

L'huile produite est liquide, homogène et possède une couleur jaune foncée.

Cette huile sera nommée ci-après : l'extrait lipidique E2 de SKC.

5 **Exemple III - Evaluation de l'effet d'un extrait lipidique de l'algue SKC sur la Communication Intercellulaire par Jonctions Communicantes (CIJC) et le taux de connexine 43 sur des KHN de donneurs âgés.**

10 L'extrait lipidique de l'algue SKC utilisé dans cet exemple est l'extrait lipidique E2 de SKC obtenu suivant le procédé d'extraction à l'éthanol décrit ci-dessus.

Les études décrites ci-dessous ont été réalisées également avec l'extrait lipidique E1 de SKC (résultats non montrés), avec des résultats comparables à ceux décrits ci-dessous et obtenus avec l'extrait lipidique E2 de SKC.

15 Les études sont réalisées sur des Kératinocytes Humains Normaux (KHN) obtenus suivant le protocole décrit dans l'exemple I (I.1.1 - Culture de Kératinocytes Humains Normaux). A la différence des témoins, les KHN traités avec l'extrait lipidique E1 ou E2 de SKC (au moment où la culture est en confluence) sont mis en contact d'une quantité « x » dudit extrait exprimée en µg par millilitre de milieu de culture et pendant 24 heures (x µg/ml/24h) avant de
20 subir des évaluations réalisées avec les techniques d'Egratignure-Chargement, de Micro-injections, ou de Cytométrie en flux, suivant les protocoles décrits dans l'exemple I (respectivement I.1.2, I.1.3, I.1.4).

• Egratignure-Chargement ou "Scrape-Loading" (Figure 4)

25 L'étude a été réalisée sur les Kératinocytes Humains Normaux (KHN) de 4 donneurs âgés de 60 à 79 ans.

Tableau IV

Modulation de la communication intercellulaire chez des KHN de différents donneurs traités avec des extraits lipidiques (E2) de SKC mesuré par la méthode d'égratignure-chargement

5

Donneurs		Traitement et doses			
		Extraits lipidiques (E2) de SKC			Témoin
Age	Données	1,25 µg/ml	2,5 µg/ml	5 µg/ml	0
63 ans	R (moyenne)	0,55	0,53	0,50	0,38
	Ecart type	0,05	0,07	0,04	0,07
79 ans	R (moyenne)	0,53	0,54	0,59	0,42
	Ecart type	0,06	0,06	0,11	0,07
60 ans	R (moyenne)	0,51	0,54	0,57	0,38
	Ecart type	0,07	0,06	0,05	0,06
73 ans	R (moyenne)	0,61	0,56	0,65	0,49
	Ecart type	0,05	0,07	0,07	0,04

Où « R » est le rapport de la surface fluorescente sur la surface totale.

10 Les résultats montrés dans le tableau IV et la figure 4 (en annexe) démontrent que les extraits lipidiques de SKC induisent une augmentation de la CIJC chez les donneurs âgés ($p < 0,0001$ -test de student).

Il y a donc une restauration de la communication cellulaire par les extraits lipidiques de SKC, à peu près au même niveau que les KHN de donneurs jeunes.

• Micro-injections (Figure 5)

L'étude a été réalisée sur 12 donneurs âgés de 49 à 79 ans.

Tableau V

5

Modulation de la communication intercellulaire chez des KHN de différents donneurs traités avec des extraits lipidiques (E2) de SKC

Donneurs		Traitement et dose	
		Extrait lipidique (E2) de SKC	Témoin
Age	Données	2,5 µg/ml	0
49 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	15,9	7,7
	Ecart type	1,5	2,0
52 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	21,4	10,9
	Ecart type	2,6	2,1
55 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	19,0	8,7
	Ecart type	2,2	1,2
55 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	13,9	8,6
	Ecart type	2,8	2,1
59 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	13,1	5,3
	Ecart type	1,7	0,9
59 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	23,4	11,0
	Ecart type	4,3	1,9
60 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	12,4	8,4
	Ecart type	1,7	1,9
61 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	13,8	8,1
	Ecart type	1,4	1,8
62 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	19,6	10,0
	Ecart type	3,9	2,9
65 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	23,9	10,9
	Ecart type	3,5	2,7
71 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	9,5	4,1
	Ecart type	1,3	1,2
79 ans	nombre de cellules marquées (moyenne)	13,9	8,3
	Ecart type	1,9	1,8

On observe une augmentation d'un facteur 2 du nombre de cellules marquées ($p < 0,0001$ -test de student). Les extraits lipidiques de SKC induisent donc une restauration de la CIJC des cellules de donneurs âgés à peu près au niveau de la CIJC des cellules de donneurs jeunes.

5

• Cytométrie en flux (Figure 6)

L'étude a été réalisée sur 6 donneurs de 49 à 60 ans.

Tableau VI

10

Modulation de la quantité de connexine 43 après traitement avec l'extrait lipidique (E2) de SKC à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ /24h mesurée en Cytométrie en Flux.

Ages des donneurs (années)	Pourcentage d'augmentation de la quantité de connexine 43 par rapport aux témoins respectifs (%)
49	31,5
52	25,5
55	30,8
59	11,5
59	19,0
60	35,2

15 On observe une augmentation moyenne de 25,6% du marquage des cellules traitées par rapport aux cellules témoins.

Les extraits lipidiques de SKC induisent une augmentation de la quantité de connexine 43.

20 Les résultats obtenus avec les différents moyens d'évaluation de l'effet d'extraits lipidiques de l'algue *Skeletonema costatum* sur la communication intercellulaire, notamment à travers les JC et sur le taux de connexine 43, réalisées sur des KHN de donneurs âgés, montrent que l'utilisation d'extraits lipidiques de l'algue *Skeletonema costatum* permet de restaurer la communication intercellulaire, notamment à travers les JC et permet également d'augmenter le

25 taux de connexine 43 présente dans les KHN.

Ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser des extraits lipidiques de l'algue *Skeletonema costatum* dans des compositions cosmétiques pour lutter contre les signes du vieillissement cutané, en particulier pour ralentir leur apparition. Les

inventeurs ont donc mis au point un nouveau moyen pour lutter contre le vieillissement cutané, en particulier contre les rides et la perte d'élasticité de la peau.

De plus, les résultats obtenus ci-dessus, montrent l'intérêt de l'utilisation d'extraits lipidiques de l'algue *Skeletonema costatum* dans des compositions cosmétiques pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'autres agents cosmétiques agissant directement dans la cellule ou par l'intermédiaire de seconds messagers intracellulaires, et présent ou non, dans la même composition cosmétique que les extraits lipidiques de SKC.

10

Exemple IV : Evaluation de l'effet de la boldine par le test d'égratignure-chargement ou "scrape-loading"

L'étude a été réalisée sur des kératinocytes humains normaux (KHN). Les concentrations utilisées sont : 12,5, 25, 50, 100 et 200 mM. Les incubations sont de 24h dans le milieu de culture. Le tableau ci-dessous résume les valeurs de surface de diffusion mesurées.

15

Tableau VII

Concentration de boldine (mM)	témoin	15,5	25	50	100	200
Surface moyenne de diffusion	0,46	0,47	0,51	0,574	0,512	0,39
Ecart type	0.07	0.06	0,04	0.03	0.66	0.08

20

Comme on peut le voir dans le tableau VII, la dose qui semble la plus efficace pour augmenter la fonctionnalité de la CIJC est 50 mM/24h. L'analyse statistique des données montre que seule cette concentration permet d'obtenir une différence réellement significative de l'augmentation de la CIJC par rapport aux KHN non traités. Les résultats du tableau VII laissent envisager un effet dose de la boldine sur la CIJC.

25

Exemple V : Crème de jour pour le visage, anti-âge

Glycéryl stéarate + PEG-100 stéarate	6,00 %
Squalane	3,00 %
Polyisobutène hydrogéné	3,00 %
Tricaprylate/caprate de glycérol	3,00 %
Glycérine	2,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	2,00 %
Cire d'abeille	1,50 %
Octanoate de cétoatéaryl	1,50 %
Alcool cétylique	1,00 %
Alcool stéarylique	1,00 %
Diméthicone	1,00 %
Extrait lipidique E2 de SKC	1,00 %
Gomme Xanthane	0,20 %
Carbomer	0,15 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

Exemple VI : Emulsion-gel pour le visage, anti-rides

5

Glycérine	5,00 %
Caprylic/capric/Succinic triglycérides	3,00 %
Extrait lipidique E2 de SKC	2,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	1,00 %
Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50 %
Hydrolysate de protéine de blé	0,50 %
Diméthicone copolyol	0,50 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

Exemple VII : Emulsion raffermissante pour le corps

Palmitate d'octyl	7,00 %
Tricaprylate/caprate de glycérol	3,00 %
Octanoate d'octyl	2,00 %
Phényl triméthicone	2,00 %
Glycérine	2,00 %
Acide stéarique	1,00 %
Stéarate de sorbitan, 20 OE	0,90 %
Alcool cétylique	0,50 %
Alcool stéarylique	0,50 %
Extrait lipidique E2 de SKC	0,50 %
Carbomer	0,40 %
Gomme Xanthane	0,20 %
Stéarate de sorbitan	0,10 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

Exemple VIII : Emulsion-gel pour le visage, anti-rides

5

Glycérine	5,00 %
Caprylic/capric/Succinic triglycérides	3,00 %
Méthoxycinnamate d'octyl	1,00 %
Acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer	0,50 %
Hydrolysate de protéine de blé	0,50 %
Diméthicone copolyol	0,50 %
Boldine	0,01 %
Neutralisant	qs.
Conservateurs	qs.
Parfum, Colorants	qs.
Eau	qsp 100,00 %

REVENDICATIONS

1. Composition cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comprend, à titre d'ingrédient actif, au moins une substance favorisant la communication
5 intercellulaire des cellules de la peau, en particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire, favorise la communication intercellulaire à travers les jonctions communicantes des cellules de la peau, en
10 particulier des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau.

3. Composition selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire, favorise la formation de connexine, en particulier de connexine 43.

4. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce
15 que ladite substance favorisant la communication intercellulaire comprend au moins un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue *Skeletonema costatum*, en particulier un extrait lipidique total de ladite algue.

5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un extrait obtenu par extraction de l'algue *Skeletonema* avec un solvant
20 alcoolique choisi parmi le groupe consistant de l'isopropanol, de l'éthanol, et du méthanol.

6. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'extrait précité est obtenu par extraction de l'algue avec de l'isopropanol.

7. Composition selon la revendication 5, caractérisée en ce que
25 l'extrait précité est obtenu par extraction de l'algue avec de l'éthanol.

8. Composition selon l'une des revendications 4 à 7, caractérisée en ce que l'extraction est réalisée sous reflux.

9. Composition selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisée en ce que l'algue est congelée avant d'être extraite avec le solvant alcoolique, de
30 préférence la congélation étant réalisée à une température située entre -40°C et -20°C environ et pendant une durée comprise de préférence entre 1 et 7 jours environ.

10. Composition selon l'une des revendications 4 à 9, caractérisée en ce que l'algue congelée est plongée directement dans le solvant alcoolique
35 chauffé.

11. Composition selon l'une des revendications 5 à 10, caractérisée en ce que l'extrait de l'algue précité est obtenu après la succession des étapes suivantes :

- 5 a) le solvant alcoolique est alcalinisé jusqu'à un pH compris entre 10 et 14, de préférence à un pH égal à 13, par exemple avec une solution aqueuse d'hydroxyde de sodium ou avec une solution aqueuse d'hydroxyde de potassium,
- b) les insolubles sont éliminés de la phase hydro-alcoolique,
- c) de l'eau distillée est ajoutée à la phase hydro-alcoolique,
- 10 d) la solution obtenue subit une extraction liquide-liquide avec un solvant apolaire non miscible avec la phase hydro-alcoolique, tel que par exemple l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane,
- e) la phase contenant le solvant apolaire est éliminée,
- f) la phase hydro-alcoolique récupérée après élimination de la phase
15 contenant le solvant apolaire, est acidifiée jusqu'à un pH compris entre 1 et 3, de préférence à un pH égal à 2, par exemple avec une solution aqueuse d'acide sulfurique ou avec une solution aqueuse d'acide chlorhydrique,
- g) la solution obtenue après acidification subit une extraction liquide-liquide avec un solvant apolaire non miscible avec la phase hydro-
20 alcoolique, tel que par exemple l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane,
- h) la phase hydro-alcoolique est éliminée,
- i) la phase contenant le solvant apolaire récupérée après élimination
25 de la phase hydro-alcoolique subit une évaporation afin d'obtenir une huile exempte de solvant apolaire, cette huile étant l'extrait recherché.

12. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'extrait précité est obtenu par extraction au CO₂ supercritique.

- 30 13. Composition selon l'une des revendications 5 à 11, caractérisée en ce que, avant toute opération d'extraction, on réalise une macération de l'algue dans le solvant alcoolique à température ambiante, de préférence pendant une durée comprise entre 5 minutes et 80 minutes environ, et de préférence encore, pendant une durée comprise entre 20 minutes et 40 minutes environ.

- 35 14. Composition selon l'une des revendications 5 à 10, ou 13, caractérisée en ce que la quantité de solvant alcoolique utilisée est comprise entre

0,1 litre et 20 litres environ de solvant, de préférence comprise entre 2 litres et 10 litres environ de solvant, pour 100 g d'algue, exprimé en poids sec d'algue.

15. Composition selon l'une des revendications 4 à 14, caractérisée en ce que l'extraction est réalisée sous atmosphère inerte, de préférence sous atmosphère saturée en azote.

16. Composition selon l'une des revendications 4 à 15, caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,01% à 10% environ, et en particulier de 0,1% à 3% environ en poids dudit extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue *Skeletonema costatum* par rapport au poids total de la composition finale.

17. Composition selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire des cellules de la peau est la boldine.

18. Composition selon la revendications 17, caractérisée en ce qu'elle comprend de 0,001% à 10% environ, et en particulier de 0,01% à 1% environ en poids de boldine par rapport au poids total de la composition finale.

19. Utilisation d'au moins une substance favorisant la communication intercellulaire des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau, comme agent cosmétique, éventuellement en présence d'un véhicule cosmétiquement acceptable.

20. Utilisation selon la revendication 19, caractérisée en ce que ladite substance favorisant la communication intercellulaire, favorise la communication intercellulaire à travers les jonctions communicantes des kératinocytes, des fibroblastes, et des pré-adipocytes de la peau.

21. Utilisation selon la revendication 19 ou 20, caractérisée en ce que la substance favorisant la communication intercellulaire favorise la formation de connexine, en particulier de connexine 43.

22. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que ladite substance comprend au moins un extrait lipidique de l'algue *Skeletonema*, notamment de l'algue *Skeletonema costatum*, en particulier un extrait lipidique total de ladite algue, notamment tel que défini à l'une quelconque des revendications 5 à 16, avantageusement un extrait obtenu par extraction liquide-liquide entre un alcool alcalinisé puis acidifié et un solvant apolaire non miscible avec la phase hydro-alcoolique, tel que par exemple l'heptane, l'hexane ou le cyclohexane.

23. Utilisation selon l'une des revendications 19 à 21, caractérisée en ce que ladite substance est la boldine.

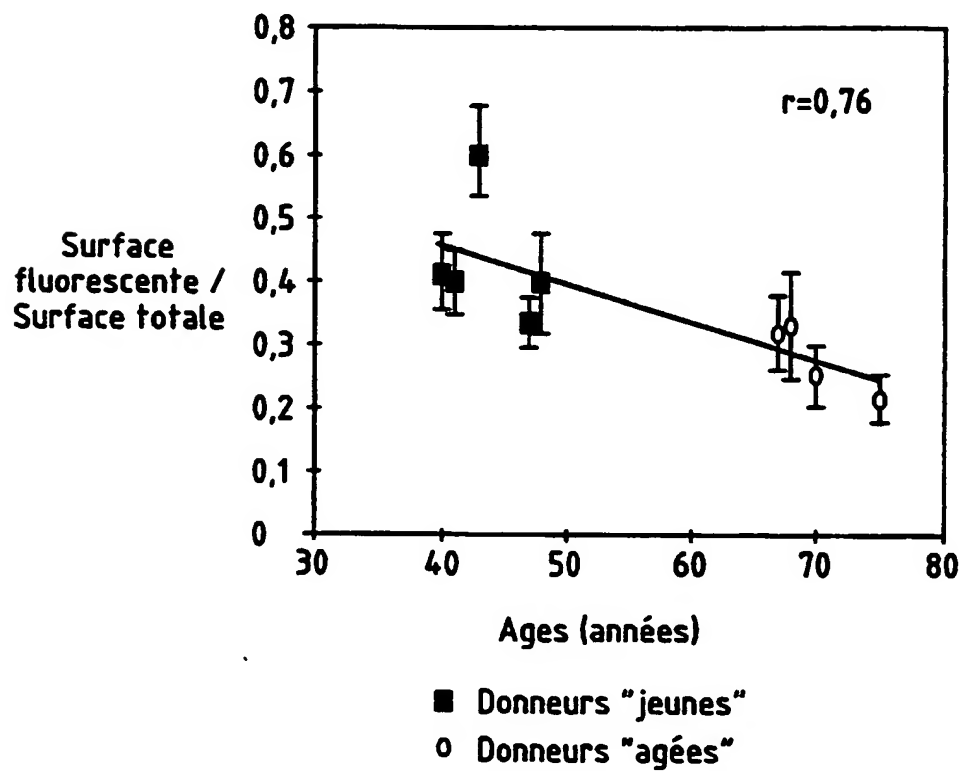
24. Procédé pour favoriser et/ou augmenter l'activité d'un agent cosmétique agissant directement dans la cellule ou par l'intermédiaire de seconds messagers intracellulaires, caractérisé en ce qu'il comprend l'application simultanée ou préliminaire à celle dudit agent cosmétique, sur les zones de la peau concernée d'une personne en ayant besoin, d'une quantité efficace d'au moins une substance favorisant la communication intercellulaire, en particulier une substance favorisant la communication intercellulaire telle que définie à l'une quelconque des revendications 2 à 18.

25. Procédé de traitement cosmétique anti-vieillessement de la peau, caractérisé en ce qu'il comprend l'application sur les zones de la peau concernée d'une personne en ayant besoin, d'une quantité efficace d'au moins une substance favorisant la communication intercellulaire, pour obtenir un effet anti-vieillessement sur lesdites zones de la peau, notamment pour améliorer la fermeté cutanée, améliorer l'élasticité de la peau, retarder l'apparition des rides ou diminuer leur profondeur, en particulier une substance favorisant la communication intercellulaire telle que définie à l'une quelconque des revendications 2 à 18.

1/5

FIG.1

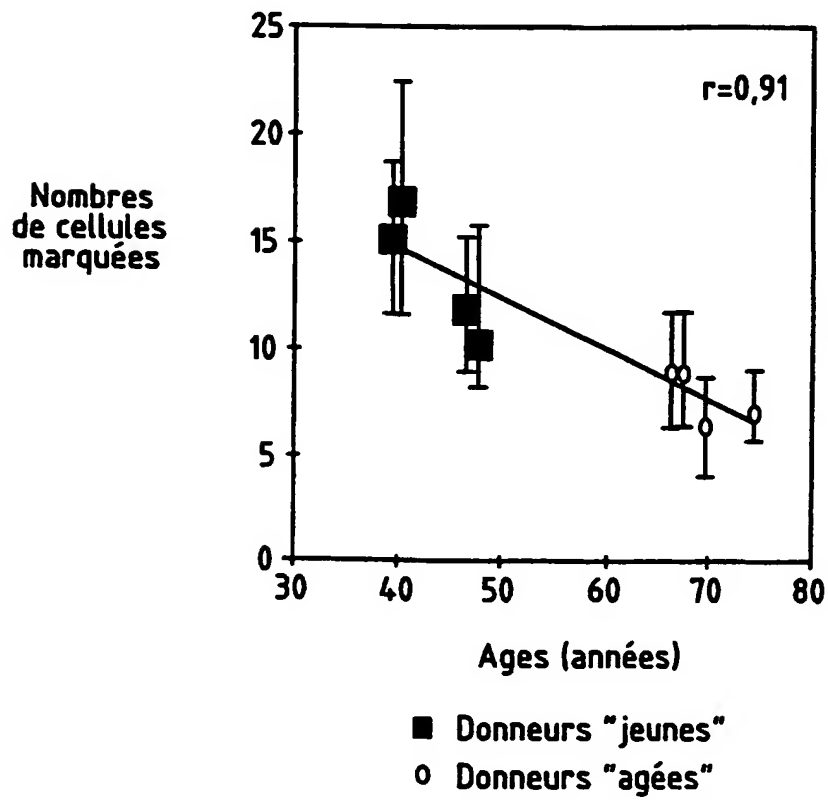
MODULATION DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE
EN FONCTION DE L'AGE DES DONNEURS PAR EGRATIGNURE-CHARGEMENT



2/5

FIG.2

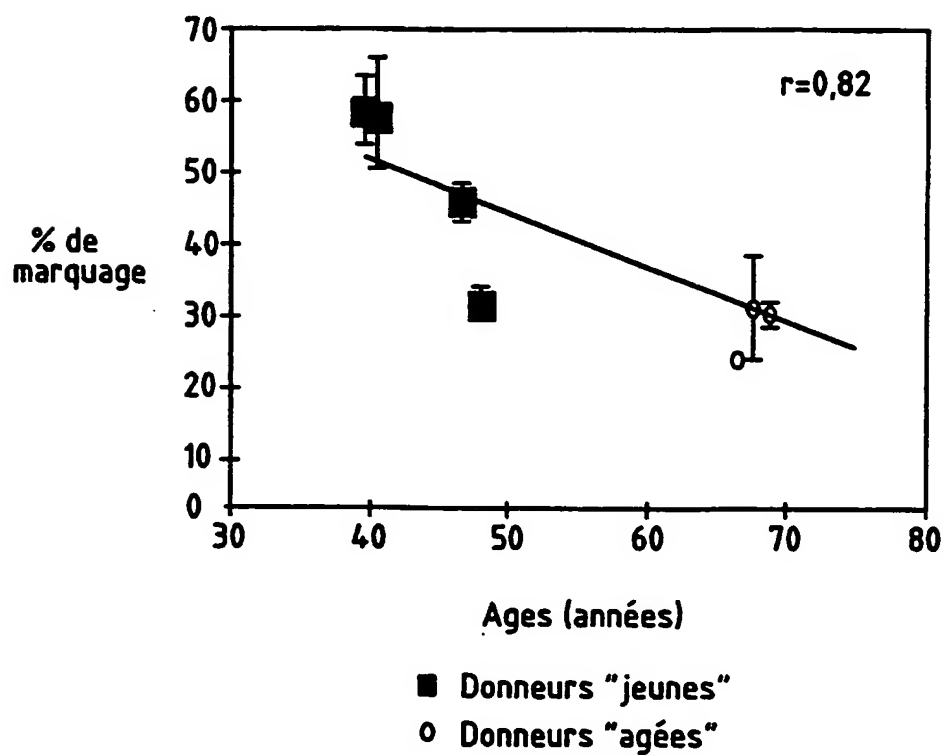
MODULATION DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE
EN FONCTION DE L'AGE DES DONNEURS PAR MICRO-INJECTION



3/5

FIG.3

EVOLUTION DU TAUX DE CONNEXINE 43 MESURE CHEZ DES KERATINOCYTES
DE DONNEURS D'AGES DIFFERENTS PAR CYTOMETRIE EN FLUX



4/5

FIG.4

MODULATION DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE
CHEZ DES KHN DE DIFFERENTS DONNEURS TRAITES AVEC UN
EXTRAIT LIPIDIQUE DE L'ALGUE SKC PAR EGRATIGNURE-CHARGEMENT

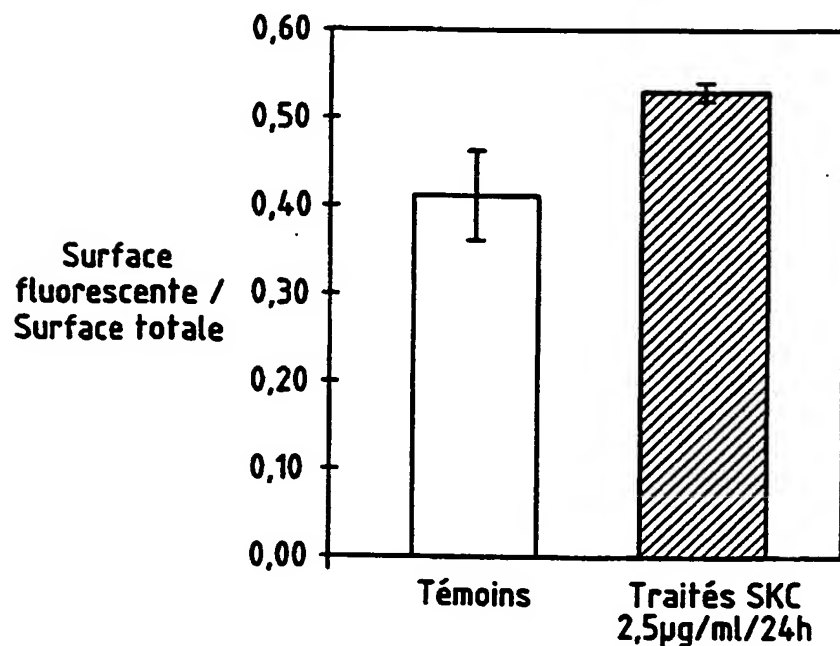
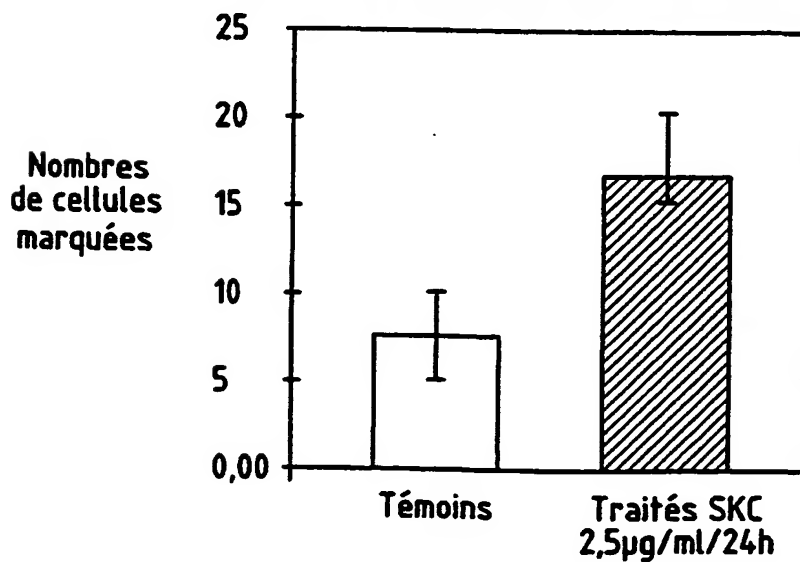


FIG.5

MODULATION DE LA COMMUNICATION INTERCELLULAIRE
CHEZ DES KHN DE DIFFERENTS DONNEURS TRAITES AVEC UN
EXTRAIT LIPIDIQUE DE SKC PAR MICRO-INJECTION



5/5

FIG.6

MODULATION DE LA QUANTITE DE CONNEXINE 43 APRES
TRAITEMENT AVEC L'EXTRAIT LIPIDIQUE DE SKC
A 2,5µg/ml/24 h MESUREE EN CYTOMETRIE EN FLUX

